

BAB 2

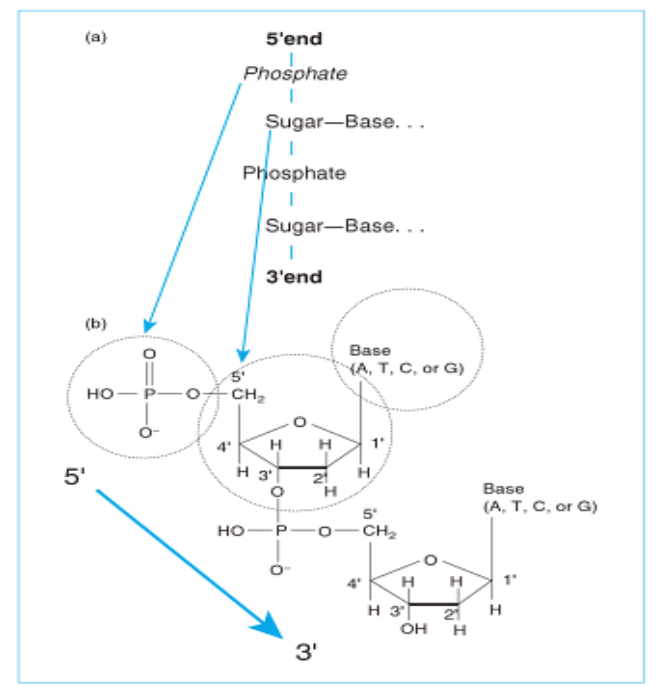
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 DNA

Unit kehidupan terkecil dari manusia adalah sel, rata-rata manusia terdiri dari 100 triliun sel. Setiap sel berfungsi menghasilkan enzim, protein, dan memproses energi. Setiap sel mempunyai kode program yang mengatur setiap kegiatan sel yaitu senyawa kimia di dalam inti sel yang disebut DNA yang berisi kode perintah untuk sel membelah diri dan menghasilkan enzim. Letak DNA yang didalam inti sel disebut *nuclear DNA*, sedangkan DNA yang terdapat diluar nukleus disebut *extranuclear DNA* yang terletak di mitokondria tempat pembentukan energi dari sel.¹⁰ DNA yang terletak pada inti sel dan DNA pada mitokondria mempunyai beberapa perbedaan antara lain¹¹:

	DNA Inti	DNA Mitokondria
Ukuran genom	3 juta bp	16.569 bp
Kopi per sel	2 (1 dari tiap induk)	Bisa lebih dari 1000
Struktur	Linier, terbungkus kromosom	Sirkuler
Diturunkan dari	Ayah dan Ibu (kecuali Y)	Ibu
Keunikan	Unik untuk tiap individu (kecuali saudara kembar identik)	Tidak sepenuhnya unik/khas
Tingkat mutasi	Rendah	5-10 kali DNA inti

Tabel 2: Perbedaan DNA Inti dengan DNA Mitokondria (Robert schleif, 2005)¹²

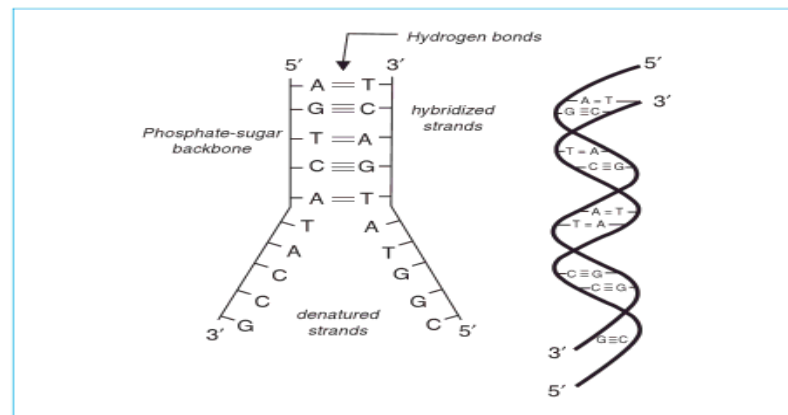


Gambar 1 : Struktur DNA² (John Butler, 2009)

DNA terdiri dari nukleotida yang terdiri dari 3 bagian yaitu : basa nukleotida, gula dan fosfat. Basa nukleotida membentuk variasi urutan dari DNA, sedangkan gula dan fosfat membentuk tulang belakang dari struktur DNA itu sendiri. Huruf pada DNA mewakili 4 basa nukleotida yaitu : A (adenin), T (Timin), C (citosin), G (guanin.). Variasi dari urutan keempat basa ini yang menyebabkan perbedaan ciri fisik diantara manusia, karena setiap 3 urutan basa nukleotida mengandung perintah untuk memproduksi asam amino tertentu yang dapat mempengaruhi ekspresi sel¹²

Pada keadaan normal di dalam sel, DNA terdiri dari rantai ganda yang disebut dengan *double helix*, struktur ini terbentuk karena ikatan hidrogen antar basa nukleotida. Aturan ikatan antar basa nukleotida tersebut adalah adenin hanya dapat berpasangan dengan timin, sedangkan guanin hanya dapat berpasangan dengan citosin. Adenin dan timin diikat oleh 2 ikatan hydrogen

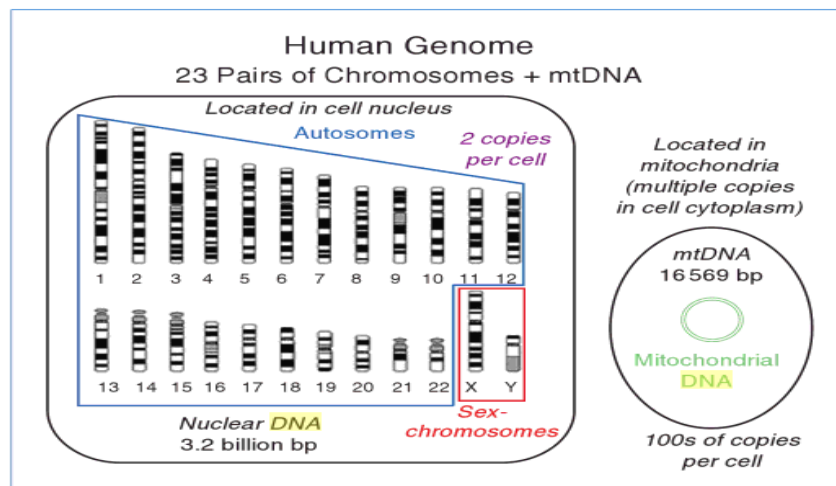
sedangkan guanin dan sitosin diikat oleh 3 ikatan hidrogen, sehingga ikatan antara guanin dan sitosin bertahan lebih lama dibandingkan ikatan adenin dan timin.²



Gambar 2 : Struktur *double helix* DNA² (John Butler, 2009)

Arah dari suatu DNA diidentifikasi dengan '5'-end' dan '3'-end', angka ini mengacu pada letak atom karbon pada cincin gula DNA. Sekuen DNA biasa ditulis dari 5'-3' seperti urutan enzim DNA polymerase membaca DNA. Kedua untai DNA yang membentuk struktur *double helix* bersifat '*anti parallel*' yang berarti jika salah satu untai DNA mempunyai urutan 5'-3' maka untai yang lain akan mempunyai urutan 3'-5'.²

Dalam tubuh manusia DNA bergabung dan dilindungi oleh protein histon sehingga membentuk kromosom. Genom manusia terdiri dari 22 pasang kromosom autosom dan 1 pasang kromosom sex yang terdiri dari kromosom X dan kromosom Y. Wanita mempunyai 2 kromosom X sehingga disebut XX, sedangkan pria mempunyai 1 kromosom X dan 1 kromosom Y sehingga disebut XY. Kebanyakan tes identitas menggunakan kromosom autosom dan pemeriksaan gender menggunakan kromosom sex.²



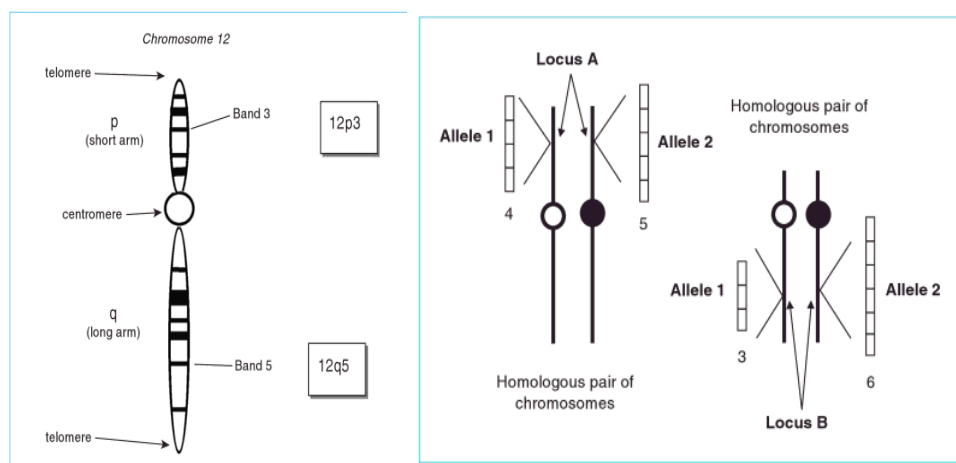
Gambar 3: Genom Manusia² (John Butler, 2009)

Semua kromosom dalam tubuh manusia adalah dalam bentuk diploid berarti terdapat 2 set dari 1 kromosom yang sama, kecuali sel gamet yaitu sperma dan ovum ada dalam bentuk haploid yaitu hanya terdapat 1 set dari kromosom yang sama sehingga pada proses pembuahan terjadi penggabungan dari kromosom ovum dari ibu dan kromosom sperma dari ayah yang menghasilkan sel diploid kembali. Mitosis adalah proses pembelahan sel autosom yang menghasilkan 2 sel anak dengan komponen genetik diploid yang mirip dengan sel induknya, sedangkan meiosis adalah proses pembelahan dari sel gamet yang menghasilkan 4 sel anak dengan komponen genetik haploid.¹⁰

Komponen DNA dalam kromosom terdiri dari DNA *coding* dan *non-coding*. *Coding DNA* disebut juga dengan gen yang terdiri dari *protein-coding regions* disebut *exons* dan *intervening sequence* disebut *intron*. Gen hanya menyusun 5% dari genom DNA manusia yang sisanya terdiri dari *non-coding DNA* karena tidak mengkode pembentukan protein, *non-coding DNA* sering

disebut dengan '*junk*' DNA, namun marker yang biasanya digunakan untuk pemeriksaan DNA ditemukan di dalam *non-coding DNA* dan di dalam *intron*.²

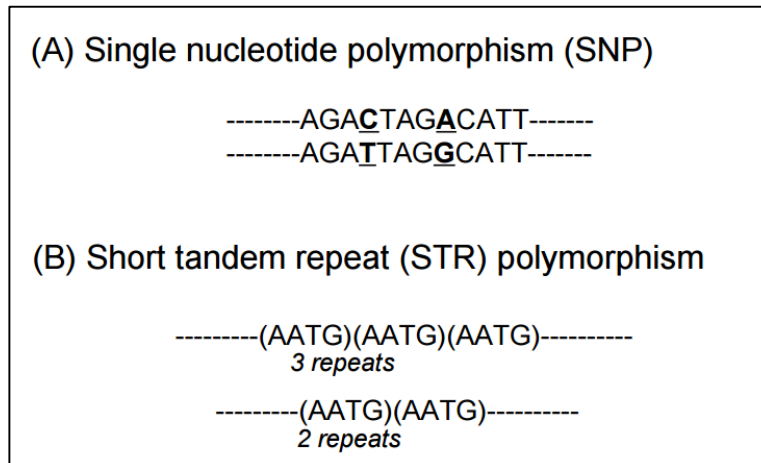
Posisi dari sebuah DNA marker dalam *non-coding DNA* disebut sebagai lokus. Sebuah kromosom dikatakan homolog apabila *copy* DNA yang sama terletak pada lokus yang sama, namun urutan DNA dalam lokus yang sama belum tentu sama karena terjadinya mutasi. Versi alternatif gen disebut dengan alel. Jika 2 alel pada lokus yang sama pada kromosom homolog sama maka disebut sebagai *homozygous*, sedangkan apabila 2 alel pada 1 lokus berbeda maka disebut *heterozygous*.²



Gambar 4 : lokus DNA² (John Butler, 2009)

Genotip adalah karakteristik alel pada suatu lokus. Jika terdapat 2 alel dalam suatu lokus, A dan a, maka genotip yang memungkinkan adalah AA Aa dan aa. AA dan aa adalah genotip *homozygous* sedangkan Aa adalah genotip *heterozygous*. DNA *profiling* adalah kombinasi genotip dari berbagai *lokus*.²

Variasi DNA disebut dengan *DNA polymorphism* yang diakibatkan karena perbedaan alel yang terdapat pada tiap lokus. Variasi yang mungkin terjadi pada level DNA adalah *sequence polymorphism* dan *length polymorphism*.²



Gambar 5: polimorfisme DNA² (John Butler, 2009)

2.1.1 DNA Dalam Forensik

Pemeriksaan identifikasi forensik merupakan pemeriksaan yang pertama kali dilakukan, terutama pada kasus tindak kejahatan yang korbannya tidak dikenal walaupun identifikasi juga bisa dilakukan pada kasus non kriminal seperti kecelakaan, korban bencana alam dan perang, serta kasus paternitas (menentukan orang tua). Secara biologis, pemeriksaan identifikasi korban bisa dilakukan dengan odontologi (gigi-geligi), anthropologi (ciri tubuh), golongan darah serta sidik DNA. Sidik DNA merupakan gambaran pola potongan DNA dari setiap individu.³

Seperti halnya sidik jari (*fingerprint*) yang telah lama digunakan oleh detektif dan laboratorium kepolisian sejak tahun 1930. Pada tahun 1980, Alec Jeffreys dengan teknologi DNA berhasil mendemonstrasikan bahwa DNA

memiliki bagian-bagian pengulangan (sekuen) yang bervariasi. Hal ini dinamakan polimorfisme, yang dapat digunakan sebagai sarana identifikasi spesifik (individual) dari seseorang. Perbedaan sidik DNA setiap orang atau individu layaknya sidik jari, sidik DNA ini juga bisa dibaca. Tidak seperti sidik jari pada ujung jari seseorang yang dapat diubah dengan operasi, sidik DNA tidak dapat dirubah.¹³

Beberapa kelebihan tes DNA dibandingkan dengan pemeriksaan konvensional lainnya adalah sebagai berikut: ¹⁴

1. Ketepatan yang tinggi

Dalam pemeriksaan DNA dapat memberikan hasil yang membedakan seorang individu dari individu yang lain secara spesifik

2. Kestabilan yang tinggi

DNA bersifat tahan pembusukan dibandingkan dengan protein.

3. Pemilihan sampel yang luas

DNA terdapat pada seluruh sel tubuh yang bernukleus

4. Dapat mengungkap kasus-kasus seperti penentuan keayahan, kasus *incest*, kasus paternitas dengan bayi dalam kandungan, kasus paternitas dengan bayi yang sudah meninggal, dan kasus paternitas untuk menentukan orang tua bayi secara biologis.

5. Dapat mengungkap kasus perkosaan dengan banyak pelaku; pemeriksaan

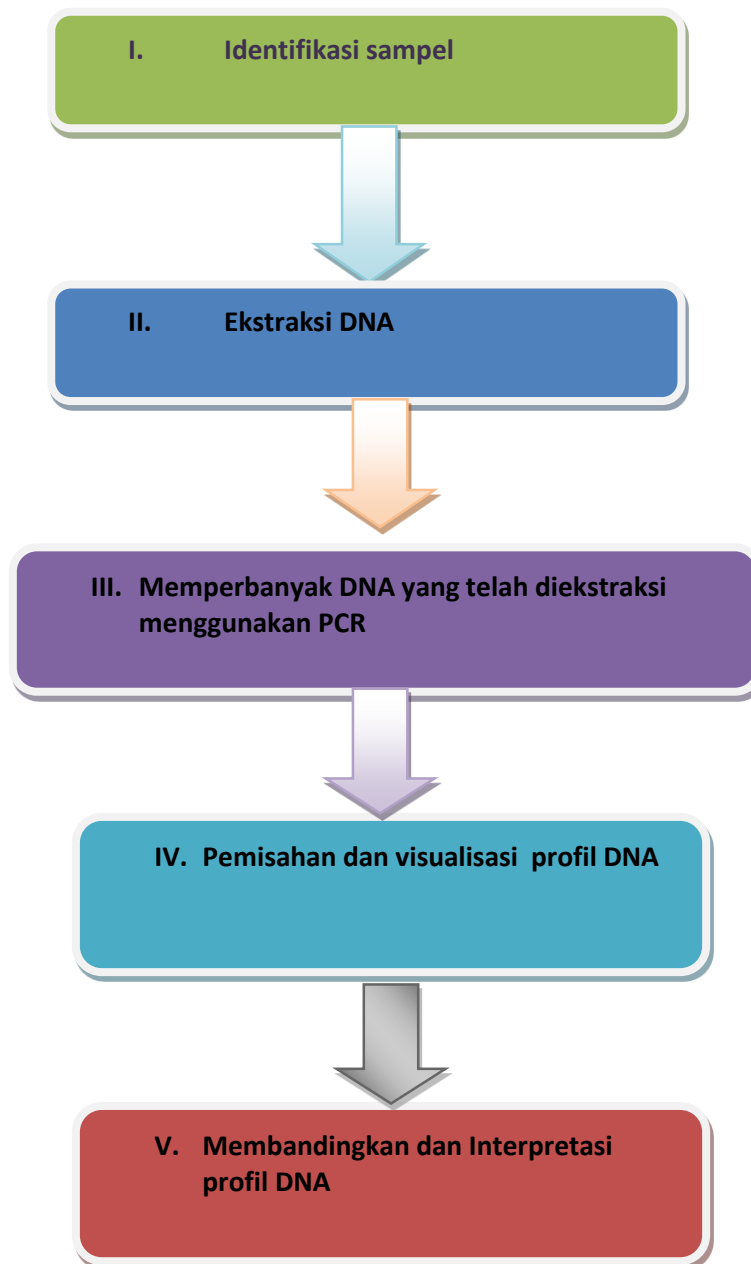
DNA dapat memastikan berapa orang pelaku dan siapa saja pelakunya

6. Sensitivitas yang amat tinggi

Dapat dilakukan pemeriksaan dengan sampel yang sangat sedikit.

2.2 Pemeriksaan DNA

Tahap pemeriksaan DNA meliputi lima langkah :



Gambar 6 : langkah pemeriksaan DNA(B.Alberts,Molecular Biology of Cell, 2002)

2.1.2 Perolehan dan Penyimpanan Sampel

Perolehan sampel DNA untuk pemeriksaan DNA forensik sangat beragam tergantung banyak sampel yang diperoleh dari sisa-sisa tempat kejadian perkara (TKP) atau sengaja diambil dari individu yang akan diperiksa seperti keluarga korban, atau tersangka, dan untuk uji paternitas.² Contoh spesimen yang dapat digunakan untuk pemeriksaan DNA adalah¹⁴ darah, urine, semen, buccal swab, swab vagina, rambut, gigi, tulang , jaringan dan spesimen biologis pada tempat kejadian perkara: pada baju /tubuh korban, pada benda yang digunakan, di lokasi kejadian.

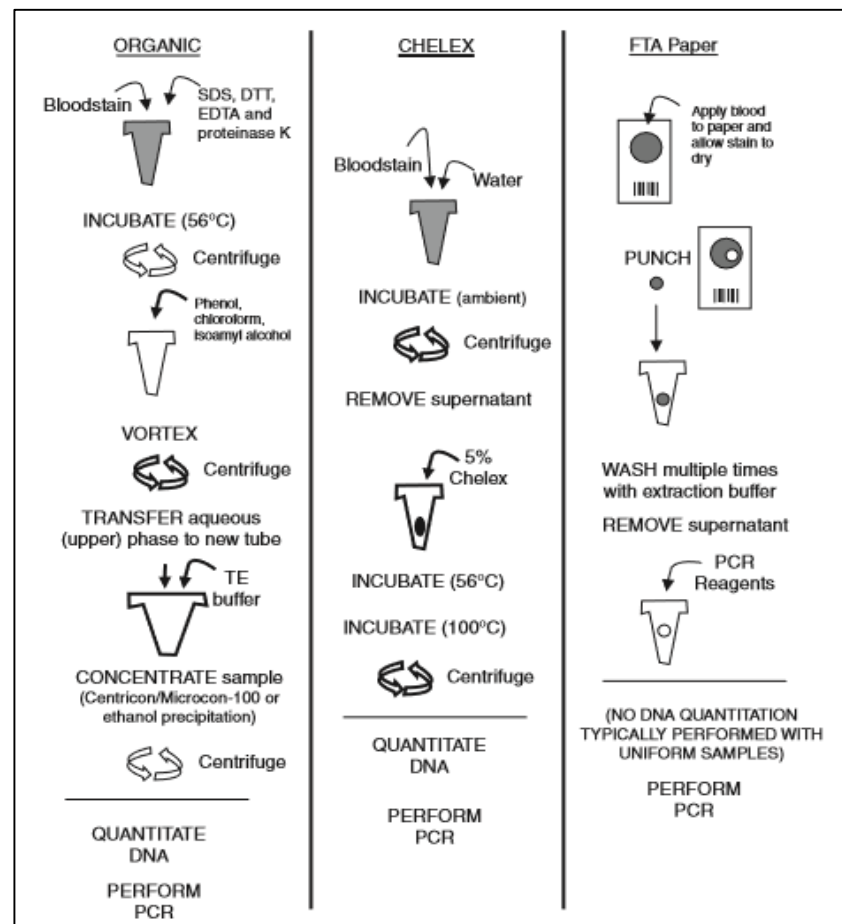
Penanganan barang dengan spesimen DNA harus dilakukan dengan hati-hati supaya menghindari kontaminasi, penanganan harus dilakukan tanpa menyentuh benda dengan tangan kosong, tidak batuk atau bersin di depan benda, setiap barang harus dibungkus secara terpisah, penyimpanan spesimen harus dalam keadaan kering, dan setiap benda harus diberi label dengan jelas mengenai identitas (bila diketahui) dan waktu pengambilan sampel.¹⁵

2.1.3 Ekstraksi dan kuantifikasi DNA

2.1.3.1 Ekstraksi DNA

Sampel biologis yang didapat dari TKP dalam bentuk darah, semen, atau jaringan mengandung beberapa substansi selain DNA. Molekul DNA harus dipisahkan dari materi seluler lainnya sebelum dapat diperiksa karena dapat mengurangi kemampuan analisis DNA. Langkah-langkah dasar pada

ekstraksi DNA adalah, pertama pelisisan sel untuk melepas molekul DNA, kedua memisahkan molekul DNA dari materi seluler lainnya, ketiga pengisolasian DNA sehingga memungkinkan untuk dilakukan analisa untuk melihat profil DNA.



Gambar 7: Metode ekstraksi² (John Butler, 2009)

1. Ekstraksi Organik

Ekstraksi organik, juga disebut ekstraksi fenol-kloroform, telah digunakan paling lama dan dapat digunakan untuk situasi di mana RFLP dan atau PCR digunakan. DNA dengan berat molekul tinggi yang penting untuk metode RFLP dapat diperoleh paling efektif melalui cara

ini namun metode ini memakan waktu lama, melibatkan bahan kimia berbahaya dan memerlukan pemindahan bahan melalui beberapa tabung sehingga menaikkan risiko kontaminasi.²

2. Metode Chelex

Metode ini dapat mengekstraksi DNA lebih cepat dari metode organik. Selain itu, ekstraksi Chelex melibatkan lebih sedikit langkah sehingga kontaminasi bisa diminimalisasi. Tes ini juga menghilangkan inhibitor PCR sehingga dapat menjadi suatu keuntungan untuk PCR.¹⁶

3. FTA *paper*

FTA *paper* adalah kertas serap berbasis selulosa. Metode ini memiliki keuntungan karena menghasilkan data konsisten dan dapat diautomatisasi.²

4. Ekstraksi fase-solid

Merupakan ekstraksi di mana DNA diikat secara selektif pada sebuah substrat seperti silica dan dilepaskan pada pencucian yang memisahkan DNA dari protein dan komponen seluler lainnya.²

5. *Differential extraction*

Modifikasi ekstraksi organik yang memisahkan sel epitel dan sel sperma. Metode ini umum digunakan untuk mengisolasi DNA pria

dan wanita pada barang bukti kasus-kasus perkosaan yang mengandung campuran kedua jenis DNA tersebut.²

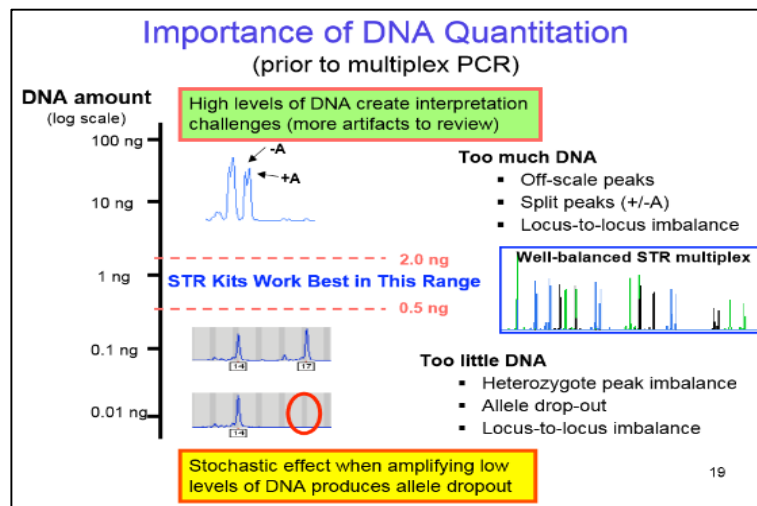
Jumlah dan kualitas DNA harus diukur lagi setelah proses ekstraksi untuk memastikan hasil yang optimal dan juga apakah DNA tersebut berasal dari manusia, serta telah terdegradasi atau belum.¹⁷ Jumlah DNA yang mungkin diekstraksi dari berbagai sampel adalah sebagai berikut:

Tipe Sampel	Jumlah DNA
Darah cair	20.000 – 40.000 ng/ml
Noda darah	250 – 500 ng/cm ²
Air mani	150.000 – 300.000 ng/ml
Swab vagina <i>postcoital</i>	10 – 3000 ng/swab
Rambut dicabut (dengan akar)	1 – 750 ng/akar
Rambut rontok (dengan akar)	1 – 10 ng/akar
Air liur	1000 – 10.000 ng/ml
<i>Buccal swab</i>	100 – 1500 ng/swab
Urin	1 – 20 ng/ml
Tulang 1 gr	3 – 10 ng/mg

Tabel 2 : jumlah DNA yang diekstraksi dari berbagai sampel⁴ (Milne E, 2006)

2.1.3.2 Kuantifikasi DNA

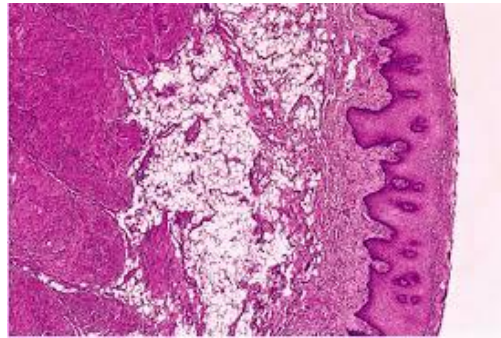
Dalam pemeriksaan DNA tidak diharapkan jumlah DNA yang terlalu kecil atau jumlah DNA yang terlalu banyak. DNA yang terlalu banyak dapat menyebabkan kesulitan saat interpretasi dan memakan waktu yang lebih lama, sedangkan DNA yang terlalu sedikit dapat mengakibatkan hilangnya alel-alel yang diperlukan untuk identifikasi DNA. Jumlah DNA yang dikehendaki untuk PCR adalah antara 0.5 ng – 2.0 ng.²



Gambar 8 : Kuantitas DNA untuk PCR² (john Butler, 2006)

Kuantitas DNA dapat diukur dengan berbagai metode antara lain :

2.2 Buccal Swab



Gambar 9: mukosa bukal¹⁸ (Victor P, Atlas Histologi DiFiore, 2010)

Pengambilan sampel dari mukosa mulut bisa menggunakan teknik *buccal swab*. Targetnya adalah sel epitel pipih berlapis (squamous epithelial cells) yang bisa diperoleh dari mukosa di bukal, namun biasanya ada sejumlah saliva yang juga terambil.

Hal ini dikarenakan mukosa mulut yang selalu mengalami perombakan (*turn over*) dengan *turn over rate* 14 hari sehingga secara alamiah memang mengalami pengelupasan (*exfoliation*) dengan *exfoliation rate* 2-4 jam.¹⁹

Faktor – faktor yang mempengaruhi mukosa mulut antara lain:

1. *Life style* : merokok, minuman beralkohol

dapat menyebabkan meningkatnya apoptosis dan perubahan DNA pada sel epitel karena tingginya radikal bebas dan menyebabkan keringnya mukosa buccal yang dapat mempengaruhi kuantitas DNA²⁰

2. Penyakit sistemik : anemia, diabetes mellitus

dapat mengakibatkan pucatnya mukosa dan menyebabkan berkurangnya proliferasi sel epitel .¹⁹

3. Radioterapi

menyebabkan kerusakan pada sel dengan tingkat regenerasi yang tinggi seperti lapisan mukosa yang terus menerus mengalami perombakan²¹

4. Infeksi

Infeksi pada area mulut dapat menyebabkan terambilnya bakteri yang dapat menjadi sumber kontaminasi dalam pemeriksaan DNA.²⁰

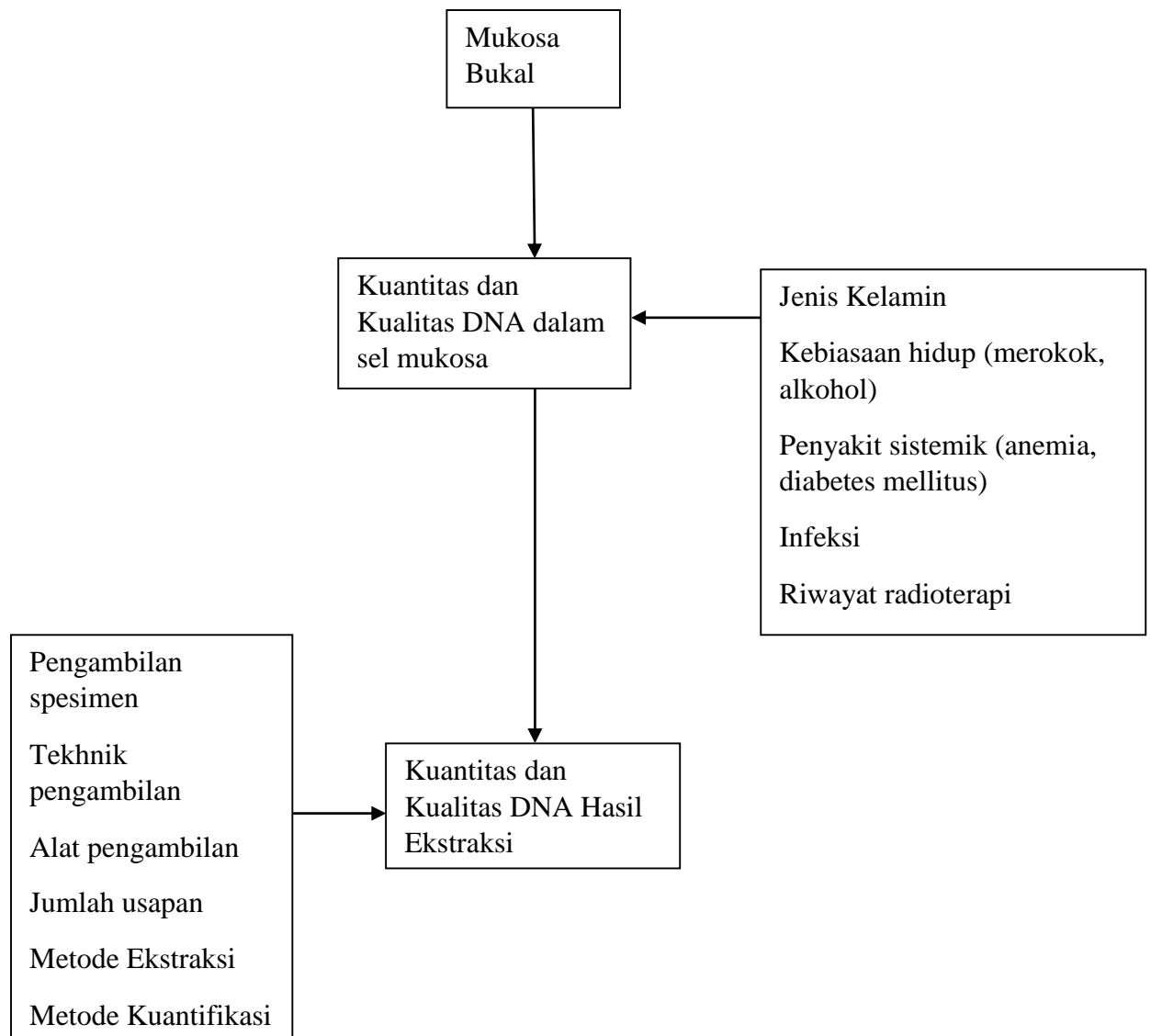
5. Jenis kelamin

pada wanita terjadi perubahan mukosa karena pengaruh hormonal akibat menstruasi, kehamilan dan menopause.²²

Faktor- faktor di atas perlu menjadi pertimbangan untuk melakukan *buccal swab* karena dapat mempengaruhi hasilnya. Pada pengambilan *buccal swab* dapat terjadi beberapa keadaan yang dapat menyebabkan hasil swab yang kurang optimal untuk pemeriksaan selanjutnya yaitu pemeriksaan DNA. Antara lain yang dapat terjadi adalah :

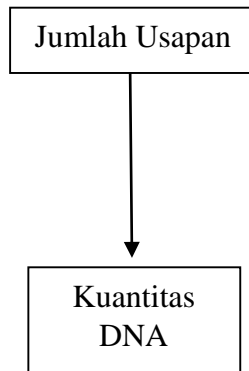
- a. Kontaminasi : tercampurnya DNA pasien dengan DNA lain yang dapat terjadi karena pemeriksa tidak menggunakan masker atau sarung tangan
- b. Degradasi : berkurangnya atau terjadinya kerusakan DNA pada sampel akibat panas, sinar matahari, air dan bahan kimia lain.
- c. *Insufficient yield* : DNA yang tidak mencapai *threshold* untuk pemeriksaan DNA.

2.4 KERANGKA TEORI



Gambar 9: Kerangka Teori

2.5 KERANGKA KONSEP



Gambar 10: Kerangka Konsep

Pada penelitian yang akan dilakukan akan dilakukan juga pengontrolan terhadap beberapa variabel sehingga tidak semua variabel yang terdapat pada kerangka teori akan diteliti pada penelitian ini. Oleh karena itu, akan dilakukan elaborasi pada variable sebagai berikut:

1. Merokok, radioterapi, diabetes, anemia, alkohol, jenis kelamin, infeksi

Pada penelitian ini akan dipilih subjek laki-laki tanpa riwayat merokok ,konsumsi alkohol, diabetes, anemia, infeksi pada area mulut dan radioterapi pada area mulut sehingga tidak sehingga tidak menyebabkan kondisi mukosa bukal yang berbeda-beda.

2. Alat pengambilan

Pada penelitian akan dilakukan penyeragaman alat pengambilan pada semua sampel yaitu menggunakan *cytoswab* termasuk cara sterilisasi alat, dan cara penyimpanan sampel.

3. Teknik pengambilan

Untuk menghilangkan perbedaan cara pengambilan maka pengambilan sampel akan dilakukan oleh peneliti sendiri pada semua individu. Dengan swab pada mukosa sebelah kanan pipi dalam semua subjek.

4. Ekstraksi dan kuantifikasi DNA

Akan digunakan metode yang sama pada semua spesimen untuk ekstraksi dan kuantifikasi DNA.

2.6 HIPOTESIS

a. Mayor

Perbedaan kuantitas DNA yang diekstraksi dari sampel *buccal swab* dengan jumlah usapan yang lebih banyak berbeda bermakna dengan jumlah usapan yang lebih sedikit.

b. Minor

1. Jumlah usapan yang paling optimal untuk memperoleh kuantitas DNA yang dibutuhkan untuk pemeriksaan DNA adalah 30 kali usapan.
2. Kuantitas DNA lebih banyak pada swab dengan 30x usapan daripada swab dengan 20x usapan.
3. Kuantitas DNA lebih banyak pada swab dengan 20x usapan daripada swab dengan 10x usapan
4. Kuantitas DNA lebih banyak pada swab dengan 10x usapan daripada swab dengan 5x usapan.